[UCI]I804:24011-200000234198

2007년 2월

박사학위 논문

쥐 종양 모델에서 인디루빈 유도체인 5'-nitro-indirubinoxime에 의한 종양 억제 효과

조선대학교 대학원

치의학과

홍 광 진

쥐 종양 모델에서 인디루빈 유도체인 5′-nitro-indirubinoxime에 의한 종양 억제 효과

Anti-tumor Activity of 5′-nitro-indirubinoxime in Rat Tumor Model

2007년 2월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

홍 광 진

쥐 종양 모델에서 인디루빈 유도체인 5′-nitro-indirubinoxime에 의한 종양 억제 효과

지도교수 윤 정 훈

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로
제출함

2006년 10월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

홍 광 진

홍광진의 박사학위 논문을 인준함

위원장　조선대학교 교수 김 수 관　인

위 원　원광대학교 교수 김 은 철　인

위 원　조선대학교 교수 안 상 건　인

위 원　조선대학교 교수 윤 정 훈　인

위 원　동국대학교 교수 김 수 아　인

2006년　12월　일

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT

Ⅰ. 서론 ····· 1

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 3

1. 인디루빈 유도체의 합성 ····· 3

2. 세포배양 ····· 3

3. MTT분석 ····· 3

4. Apoptosis 측정 ····· 4

5. Immunoblotting ····· 4

6. *In vivo*에서 종양 성장의 측정 ····· 5

7. 병리조직, 면역조직화학 및 TUNEL 분석 ····· 5

8. 통계 분석 ····· 6

Ⅲ. 결과 및 토의 ····· 7

1. 5′-nitro-indirubinoxime에 의한 종양 세포 증식의 억제 ····· 7

2. RK3E-ras 세포에서 5′-nitro-indirubinoxine에 의한 apoptosis의 유도 ····· 7

3. *In vivo*에서 5′-nitro-indirubinoxine에 의한 고형 종양의 성장 억제 ····· 8

4. *In vivo*에서 5′-nitro-indirubinoxine에 의한 구강 종양의 성장 억제 ····· 9

5. 5′-nitro-indirubinoxine에 의한 종양세포 증식 억제와 apoptosis의 유도 ····· 9

참고문헌 ····· 11

표목차

Table 1. 종양세포에 대한 인디루빈과 그 유도체의 증식 억제 효과 ····· 7

도목차

Fig. 1. 인디루빈 유도체의 화학적 구조. ····· 14

Fig. 2. RK3E-ras 세포에서 5′-nitro-indirubinoxime에 의한 apoptosis의 유도. ····· 15

Fig. 3. 쥐 종양 모델에서 5′-nitro-indirubinoxime의 항암효과. ····· 16

Fig. 4. 구강 종양 모델에서 5′-nitro-indirubinoxime의 항암 작용 ····· 17

Fig. 5. RK3E-ras 세포로 유도된 종양의 조직학적, 면역조직화학적 소견. ····· 18

ABSTRACT

Anti-tumor Activity of 5′-nitro-indirubinoxime in Rat Tumor Model

Kwang-Jin Hong

Advisor : Prof. Jung-Hoon Yoon

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

Indirubin is the active ingredient of a traditional Chinese herbal medicine, Danggui Longhui Wan, used for the treatment of chronic myelocytic leukemia. Here, we report that novel indirubin derivative, 5′-nitro-indirubinoxime (5′-NIO), has potent anti-proliferative activity on various human cancer cells and oncogenic RK3E-ras rat kidney cells with half-inhibitory concentrations (IC_{50}) ranging from 1-12 M. Treatment with indirubin derivative induced the activation of caspase 7 followed by apoptosis in RK3E-ras cells. Indirubin derivative showed strong anti-tumor activity in rat solid and oral tumor models. Direct injection of indirubin derivative every other day for 10 days induced significant inhibition of tumor growth in Sprague-Dawley rats bearing RK3E-ras-induced tumors. Histologically, treatment with indirubin derivative caused significant inhibition of tumor formation with increased apoptosis and decreased tumor cell proliferation. These findings provide the potential value of indirubin derivative as a novel candidate for anti-tumor agents.

Key words: indirubin derivatives, 5′-nitro-indirubinoxime, anti-tumor activity, apoptosis, antiproliferation

I. 서 론

인디루빈은 전통 중국 의학에서 만성 골수성 백혈병(chronic myelocytic leukemia)과 같은 만성 질환을 치료하는데 사용되는 Danggui Longhui wan의 11가지 한약재의 주원료이다[1,2]. 임상 실험을 통하여 인디루빈이 만성 골수성 백혈병의 치료에 매우 효과적이라는 사실이 입증된바 있다[1,3]. 그러나 기존의 인디루빈은 낮은 용해도와 흡수도, 위장관 자극과 같은 문제점이 있어 지난 20년간 많은 연구자들에 의해 인디루빈의 약리적 특성을 개선하기 위한 새로운 인디루빈 유도체를 합성하려는 노력이 진행되어 왔다.

최근의 연구에 의하면 인디루빈과 그 유도체들이 cyclin-dependent kinases (CDK-1, -2, -4 and -5)의 강력한 억제제로 세포주기를 중지시킴으로써 세포 증식을 억제한다는 사실이 보고되었다[4-6]. 인디루빈을 처리한 종양세포는 세포주기가 G_1/S나 G_2/M 기에 정지되고 apoptosis에 의해 세포 증식이 억제된다[4,6]. 단백질의 구조분석 연구를 통하여 인디루빈이 CDKs에 강한 친화력이 있어 CDKs의 촉매 합성부위에 ATP와 경쟁적으로 결합함으로써 CDKs의 활성도를 억제한다는 사실이 밝혀졌다[6,7]. 또한, 인디루빈 유도체들은 폐, 유방, 전립선 암 세포와 같은 몇몇 사람 암세포에서 apoptosis를 유발함이 보고되어 다양한 종류의 악성종양 치료에 이용할 수 있을 것이라는 가능성이 제시되었다[8-12].

현재까지 보고된 인디루빈 유도체 중에서 indirubin-3′-monoxime이 가장 효과적이다. Indirubin-3′-monoxime은 세포주기를 G_1 말기와 G_2/M 기에서 정지시키거나 apoptosis를 유발하여 세포 증식을 억제한다[11-13]. 또한 indirubin-3′-monoxime은 알츠하이머병에서 전형적으로 신경섬유의 얽힘을 일으키는 tau의 비정상적인 과인산화를 억제한다[14]. Indirubin-3′-monoxime이 신경 세포사의 중요한 조절인자인 c-Jun NH_2-terminal protein kinase (JNK)와 신경변성 장애를 일으키는 glycogen synthase kinase-3β (GSK3β)의 강력한 억제제라는 사실도 보고되었다[11,12]. 또 다른 인디루빈

유도체인 meisoindigo는 종양세포에서 DNA의 합성과 미세소관의 결합을 강하게 억제한다[15]. 또한, meisoindigo는 *c-myb*의 발현을 억제하여 백혈병 세포의 분화를 유도하기도 한다[16].

이 연구에서는 인디루빈의 항암효과를 증대시키고자 5′-nitro-indirubinoxime이라는 새로운 인디루빈 유도체를 합성하고, 이 새로운 인디루빈 유도체가 *in vitro*에서 종양세포의 증식에 강력한 억제작용이 있음을 보였다. 또한, 5′-nitro-indirubinoxime을 쥐 종양 실험 모델에 사용하여 5′-nitro-indirubinoxime이 강력한 종양 성장 억제제임을 증명하였다.

II. 재료 및 방법

1. 인디루빈 유도체의 합성

인디루빈을 pyridine에 용해시키고, magnetic stirring을 통해 hydroxylamine hydrochloride (10 equiv.)를 가한 후, reflux (80-90℃) 조건에서 2시간 동안 가열하였다. 감압 조건하에서 용액을 증발시키고 잔류물은 물과 cyclohexane으로 세척하였다. Fig.1와 같이 인디루빈 구조에서 R- group을 Nitro-(5′-nitro-indirubinoxime) group으로 치환시켰다.

5′-NIO: -NO_2 (5′-Nitro-1*H*,1′*H*-[2,3′]biindolylidene-3,2′-dione 3-oxime) ^{1}H NMR(300 MHz, DMSO-d_6) δ(ppm) 13.92(1H, s, NOH) 11.90(1H, s, N-H), 11.44(1H, s, N′-H), 9.47(1H, s), 8.27(1H, d, *J*=7.5Hz), 8.10(1H, dd, *J*=2.3, 8.4Hz), 7.48(2H, m), 7.09(2H, m), MS(MALDI -TOF) m/z: 321.0

2. 세포 배양

세 종류의 사람 암세포 (A549, 폐 암종; SNU-638, 위 암종; HT1080, 섬유육종)를 37℃, 5% CO_2의 조건하에 10% fetal calf serum, 100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin을 함유한 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 쥐의 신장 상피세포 RK3E와 k-*ras* 로 형질전환된 RK3E-ras는 10% fetal calf serum, 100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium에서 배양하였다. RK3E-ras 세포는 Dr. Eric Fearon (University of Michigan Medical School)이 제공하였다[17].

3. MTT 분석

다양한 종류의 암세포에 대한 인디루빈 유도체의 증식 억제효과는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) dye uptake 방

법으로 조사하였다[18]. 이를 간단히 요약하면, 세포를 24 well plate에 심고, 24시간동안 인디루빈이나 인디루빈 유도체를 처리하였다. 각 well은 PBS로 두 번씩 세척한 후, 세포 배양액 0.25 ml과 MTT 용액 25 μl(5 mg/ml in PBS)를 가하였다. 3시간 후 배양액을 제거하고 acid-isopropanol (0.04 M HCL in isopropanol) 125 μl를 가하고 OD 값은 Microplate Autoreader EL 311 (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT)를 사용하여 570 nm에서 측정하였다.

4. Apoptosis 측정

RK3E-ras 세포를 10μM의 5′-nitro-indirubinoxime로 24시간동안 처리하고 Annexin V-FLUOS staining kit (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)를 이용하여 Annexin V-FITC와 propidium iododide (PI)로 표지하였다. Apoptosis된 세포들은 디지털 카메라가 장착된 형광 현미경 (Nikon Eclipse E800)으로 관찰하였다. Flow cytometry 분석은 Cell Quest software를 사용하여 FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)로 측정하였다.

5. Immunoblotting

RK3E-ras 세포를 5′-nitro-indirubinoxime로 24시간동안 처리한 후 PBS로 두 번씩 세척하고, RIPA buffer(1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM PMSF, 1 μg/ml aprotinin, 1 mM sodium orthovanadate가 포함된 PBS)로 용해하였다. 세포 용해물을 4℃에서 30분간 incubation한 후 10,000Xg로 10분간 원심분리 하였다. Immunoblotting을 위해 단백질(10μg/lane)은 12% SDS-Polyacrylaide gel 상에서 전기영동 하고, anti-caspase 7 antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), anti-cleaved caspase 7 antibody (Cell Signaling Technology), anti-PCNA antibody (Dako, Glostrup, Denmark), anti-actin antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa CS)를 이용하여 immunoblotting 하였다.

6. *Invivo*에서 종양성장의 측정

3주된 수컷 Sprague-Dawley rats (Samtaco, Korea)을 표준 주거환경에서 사육하였다. RK3E-ras나 RK3E-ras-Fluc 세포는 trypsinization을 하여 얻은 후 원심분리하고 세포 수가 2.5 x 10^7 cells/ml이 되도록 혈청성분 없는 DMEM 배지로 희석하였다. 각각의 쥐에 400 μl 의 세포 (total 10^7 cells)를 22-gauge 바늘을 이용하여 왼쪽 옆구리에 주사하였다. 구강 점막에는 200 μl의 세포 (total 5 x 10^6 cells)를 주사하였다 (각 그룹의 n=5). 5′-nitro-indirubinoxime은 구강점막과 피하에 세포를 주사한 뒤 각각 3일과 6일 째부터 처리하였다. 5′-nitro-indirubinoxime(10 μM/100 μl)나 같은 용량의 DMSO 용액을 2일에 한번 씩 총 5회 종양에 직접 주사하였고 실험 마지막 날 실험동물에서 종양을 절제하였다.

체중은 매일 측정하였으며 종양의 부피는 실험이 끝날 때까지 3일에 한번 씩 측정하였고, Carlsson에 의해 정의된 공식 $V=(ab^2)/2$ ('a'는 종양의 최대직경, 'b'는 종양의 최소직경)로 계산하였다[19]. 모든 실험은 조선대학교 치과대학의 '동물 보호 및 사용 위원회'에서 승인한 협의서를 준수하여 시행하였다.

7. 병리조직, 면역조직화학 및 *TUNEL* 분석

절제된 종양은 10% 중성 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매하였다. 광학 현미경 검사를 위해 4 μM씩 박절한 조직을 hematoxylin-eosin (H-E)으로 염색하였다.

면역조직화학 염색은 anti-PCNA antibody (Dako)를 사용한 avidin-biotin peroxidase complex (ABC) method로 시행하였다. 면역 반응은 diaminobenzidine (DAB)로 관찰하였으며, Mayer씨 hematoxylin으로 대조염색 하였다. PCNA에 양성인 세포의 수를 X200 시야에서 가장 많은 5 부위의 평균을 구하였다.

TUNEL 분석은 ApopTag® Plus Peroxidase In SituApoptosis Detection Kit (Intergen, Purchase, NY)을 이용하여 수행하였다. 슬라이드에서 파라핀을 제거하고

37℃에서 15분간 20 μg/ml의 proteinase K로 처리하였다. 내인성 과산화효소를 차단하기 위해 3% 과산화수소에 담근 후 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)를 포함한 37℃ 반응 완충액에서 1시간동안 incubation 하였다. 과산화효소와 결합한 anti-dioxygenin antibody와 30분간 incubation한 후 반응 산물을 2 mM hydrogen peroxide을 함유한 0.03% 3′-3 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 용액으로 발색시켰다. 0.5% methyl green으로 대조염색을 하였다. TUNEL 양성인 세포의 수를 X200 시야에서 가장 많은 5 부위의 평균을 구하였다.

8. 통계 분석

각 그룹의 평균값을 구하고 평균±SD로 표현하였다. 모든 통계적 계산은 Microsoft Excel을 사용하여 산출하였다.

II. 결과 및 토의

*1.5′-nitro-indirubinoxime*에 의한 종양세포증식의 억제

새로운 항암제의 개발을 위하여 인디루빈 유도체 5′-nitro-indirubinoxine을 합성하였다 (Fig. 1). 5′-nitro-indirubinoxime이 다양한 사람 암세포 (A549,폐 암종; SNU-638, 위 암종;HT-1080, 섬유육종)와 k-*ras* 유전자가 과발현되는 쥐의 신장 상피세포 RK3E-ras의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 인디루빈과 인디루빈 유도체의 IC_{50} 값은 Table 1.에 나타내었다. 5′-nitro-indirubinoxine은 인디루빈이나 indirubin-3′-monoxime보다 뛰어난 성장 억제 효과가 나타났으며, 사람 암세포에 대한 5′-nitro-indirubinoxine의 IC_{50} 값은 1.2에서 12.2 μM 범위에 있었다. RK3E-ras 세포도 5′-nitro-indirubinoxine에 매우 효과적으로 반응하여 1.0에서 6.4의 IC_{50} 값을 보였다.

Table 1. 종양세포에 대한 인디루빈과 그 유도체의 증식 억제 효과

Indirubin derivative	IC_{50} (M)			
	A549	SNU-638	HT-1080	RK3E-ras
Indirubin	31.0	>100	42.2	n.d
Indirubin-3′-monoxime	62.0	>100	4.8	n.d
5′-nitro-indirubinoxime	5.4	1.2	5.9	1.0

2. RK3E-ras 세포에서 *5′-nitro-indirubinoxine*에 의한 *apoptosis*의 유도

5′-nitro-indirubinoxine의 성장 억제 효과가 apoptosis에 의해 일어나는가를 조사하였다. Annexin V-FLUOS staining kit (Roche Molecular Biochemicals)을 이용하여 RK3E-ras 세포를 10 μM의 5′-nitro-indirubinoxine로 24시간동안 처리하고, 정량적인 결과를 얻기 위해 flow cytometric analysis를 수행하였다. Fig. 2A에서와 같이,

5′-nitro-indirubinoxine는 apoptosis를 유도하였다. Annexin-V-FLUOS 분석에서도 5′-nitro-indirubinoxine를 처리한 RK3E-ras 세포가 처리하지 않은 대조군 세포들에 비해 apoptosis가 일어난 세포 수가 크게 증가하였다 (Fig. 2B).

Apoptosis에 의한 세포사의 중요한 effector caspase인 caspase 7의 활성도를 Western blot 분석을 통해 조사하였다. 실험 결과 5′-nitro-indirubinoxine을 처리한 RK3E-ras 세포에서는 활성화된 cleaved caspase 7이 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다 (Fig. 2C, upper panel). Caspase 3 또한 5′-nitro-indirubinoxine 처리에 의해 활성화되었다 (data not shown). 반면에, 세포 증식의 표시자인 PCNA의 발현은 5′-nitro-indirubinoxine의 처리에 크게 감소하였다 (Fig. 2C, middle panel). 이상과 같은 결과는 5′-nitro-indirubinoxine가 caspase 7의 활성화를 통해 세포의 증식을 강하게 억제하고 apoptosis를 유도한다는 사실을 보여주고 있다.

3. *Invivo*에서 *5′-nitro-indirubinoxine*에 의한 고형 종양의 성장 억제

최근 조선대학교 치과대학 구강병리학교실에서 Sprague-Dawley rats에서 RK3E-ras 세포를 이용하여 빠르게 악성종양을 유도하는 동물 모델을 개발하였다[20]. 이 종양 동물 모델은 항암제의 효과를 단기간 내에 조사할 수 있다는 장점이 있다. 종양의 성장에 대한 5′-nitro-indirubinoxine의 효과를 조사하기 위하여, SD rat의 왼쪽 옆구리에 RK3E-ras 세포를 주사하였다. RK3E-ras 세포의 주사 후 3일째부터 종양의 형성을 관찰할 수 있었다. 세포 주사 6일 후부터 5′-nitro-indirubinoxine (10 μM/100 μl)을 2일에 한번 씩 총 5회를 고형 종양에 직접 주사하였다. 종양의 성장은 3일 간격으로 caliper를 이용해 측정하였는데 Fig. 3A에서와 같이 5′-nitro-indirubinoxine은 종양의 성장을 효과적으로 억제하였으며 5′-nitro-indirubinoxine을 10 일간 (세포 주사 후 15일)처리하였을 때 종양의 성장이 완벽하게 억제되었다. 5′-nitro-indirubinoxine 주사 10 일째에 Softex X-ray를 촬영하였는데 Fig. 3B에서와 같이 5′-nitro-indirubinoxine을 처리한 쥐는 종양 크기가 크게 감소되는 것을 확인하였다.

이상과 같은 결과는 조선대학교 치과대학 구강병리학교실의 쥐 종양 동물 모델에서 5′-nitro-indirubinoxine이 효과적으로 종양의 성장을 억제한다는 사실을 보이며 *in vitro* 결과와 일치한다. 경구나 혈관내로는 5′-nitro-indirubinoxine을 투여하지는 않았다. 항암제의 고농도 국소 투여는 약동학적 원리를 따르는데 약제의 직접 투여는 인접 종양에 약물의 효과를 증가시킬 뿐 아니라 종양 세포가 약물에 장시간 노출되도록 하는 장점이 있다[21,22]. 5′-nitro-indirubinoxine은 직접 주사를 통해 강한 종양 성장 억제 효과를 보였으며 실험 기간 동안 어떠한 부작용도 없었다.

*4. Invivo*에서 *5′-nitro-indirubinoxine*에 의한 구강 종양의 성장 억제

RK3E-ras 세포를 이용하여 구강 종양 동물 모델을 확립하기 위하여 "재료 및 방법"에서 기술한 것과 같이 SD rat의 구강점막에 RK3E-ras 세포를 주사하였는데 주사 후 3일째부터 구강 종양의 형성을 관찰할 수 있었다. 구강 종양의 성장에 대한 5′-nitro-indirubinoxine의 효과를 조사하기 위하여 RK3E-ras 세포 주사 3일 후부터 구강 종양에 5′-nitro-indirubinoxine (10 μM/100 μl)를 2일에 한번 씩 총 5회 직접 주사하였다. 약제 주입 후 10일째(세포 주사 후 12일째)에 Softex x-ray를 촬영한 결과 5′-nitro-indirubinoxine이 효과적으로 구강 종양의 성장을 억제함을 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 세포 주사 후 12일째에 인디루빈 치료를 하지 않은 대조군에서는 종양이 골내와 림프절, 타액선까지 전이됨이 관찰되었다 (data not shown).

*5. 5′-nitro-indirubinoxine*에 의한 종양세포 증식 억제와 *apoptosis*의 유도

조직학적으로 구강 종양은 많은 유사분열의 양상과 여러 부위의 괴사, 출혈을 보이는 악성의 미분화 암종이었다 (Fig. 5A). 그러나 5′-nitro-indirubinoxine을 처리하면 석회화를 동반한 육아종성 염증으로 둘러싸인 광범위한 세포사가 유도되며 5′-nitro-indirubinoxine이 처치된 부위는 핵의 응축과 세포질의 호산성 증가를 보이는 괴사와 함께 종양 세포의 현저한 감소가 관찰되었다 (Fig. 5A)

PCNA에 대한 면역조직화학 염색에 DMSO를 처치한 대조군에서는 대부분의 종양 세포가 양성을 보이며 높은 증식력을 가지는 반면 5′-nitro-indirubinoxine을 처리한 경우 PCNA 양성 세포의 수가 현저하게 감소됨을 보였다 (Fig. 5A와 5B). 대조군과 비교할 때 PCNA 양성 세포는 5′-nitro-indirubinoxine을 처리한 경우 17%였다 (Fig. 5B).

*In vivo*에서 apoptosis가 유도된 세포를 확인하기 위하여 TUNEL assay를 수행하였다. TUNEL에 양성인 세포의 비율이 5′-nitro-indirubinoxine을 처리한 군에서 대조군에 비하여 현저하게 증가되었다 (Fig. 5A와 5C). 5′-nitro-indirubinoxine을 처리했을 때 TUNEL에 양성인 세포의 수는 대조군에 비해 11.1배 증가하였다 (Fig. 5C) 이상과 같은 결과는 새로운 인디루빈 유도체인 5′-nitro-indirubinoxine이 세포증식의 억제와 apoptosis의 활성화를 통해 RK3E-ras 세포로 유도된 종양의 성장을 강하게 억제한다는 *in vitro*의 결과를 확인하였다.

이 연구에서는 새로운 인디루빈 유도체인 5′-nitro-indirubinoxine이 세포 증식을 억제하고 apoptosis를 유도함으로써 종양의 성장을 효과적으로 저해한다는 사실을 보여주었다. 인디루빈은 종양 세포에 많은 생화학적 변화를 일으킨다. 인디루빈과 그 유도체들은 CDKs의 조절에 중요한 역할을 수행함으로써 종양 세포의 성장 억제를 유도한다. 이 연구에서는 새로운 인디루빈 유도체인 5′-nitro-indirubinoxine이 caspase 7의 활성화를 통해 apoptosis를 유도한다는 사실을 보였으나 5′-nitro-indirubinoxine에 의해 유도되는 apoptosis의 분자적 기전은 아직 완전하게 이해되지 않고 있다. 앞으로 5′-nitro-indirubinoxine에 의해 유도되는 apoptosis의 분자의 기전을 밝혀내기 위해 더 많은 생화학 및 세포학적 연구가 필요하다.

참고문헌

1. Zhang ZN, Liu EK, Zheng TL, Li DG. Treatment of chronic myelocytic leukemia (CML) by traditional Chinese medicine and Western medicine alternately. J Tradit Chin Med 1985; 5: 246-8.

2. Xiao Z, Hao Y, Liu B, Qian L. Indirubin and meisoindigo in the treatment of chronic myelogenous leukemia in China. Leuk Lymphoma 2002; 43: 1763-8.

3. Han J. Traditional Chinese medicine and the search for new antineoplastic drugs. J Ethnopharmacol 1988; 24: 1-17.

4. Marko D, Schatzle S, Friedel A, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells. Br J Cancer 2001; 84: 283-9.

5. Mapelli M, Massimiliano L, Crovace C, et al. Mechanism of CDK5/p25 binding by CDK inhibitors. J Med Chem 2005; 48: 671-9.

6. Hoessel R, Leclerc S, Endicott JA, et al. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. Nat Cell Biol 1999; 1: 60-7.

7. Polychronopoulos P, Magiatis P, Skaltsounis AL, et al. Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases. J Med Chem 2004; 47: 935-46.

8. Lee JW, Moon MJ, Min HY, et al. Induction of apoptosis by a novel indirubin-5-nitro-3′-monoxime, a CDK inhibitor, in human lung cancer cells. Bioorg Med Chem Lett 2005; 15: 3948-52.

9. Nam S, Buettner R, Turkson J, et al. Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:

5998-6003.

10. Eisenbrand G, Hippe F, Jakobs S, Muehlbeyer S. Molecular mechanisms of indirubin and its derivatives: novel anticancer molecules with their origin in traditional Chinese phytomedicine. J Cancer Res Clin Oncol 2004; 130: 627-35.

11. Xie Y, Liu Y, Ma C, et al. Indirubin-3′-oxime inhibits c-Jun NH2-terminal kinase: anti-apoptotic effect in cerebellar granule neurons. Neurosci Lett 2004; 367: 355-9.

12. Damiens E, Baratte B, Marie D, Eisenbrand G, Meijer L. Anti-mitotic properties of indirubin-3′-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest. Oncogene 2001; 20: 3786-97.

13. Duensing S, Duensing A, Lee DC, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor indirubin-3′-oxime selectively inhibits human papillomavirus type 16 E7-induced numerical centrosome anomalies. Oncogene 2004; 23: 8206-15.

14. Leclerc S, Garnier M, Hoessel R, et al. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors. J Biol Chem 2001; 276: 251-60.

15. Ji XJ, Liu XM, Li K, Chen RH, Wang LG. Pharmacological studies of meisoindigo: absorption and mechanism of action. Biomed Environ Sci 1991; 4: 332-7.

16. Liu XM, Wang LG, Li HY, Ji XJ. Induction of differentiation and down-regulation of c-myb gene expression in ML-1 human myeloblastic leukemia cells by the clinically effective anti-leukemia agent meisoindigo. Biochem Pharmacol 1996; 51: 1545-51.

17. Kolligs FT, Hu G, Dang CV, Fearon ER. Neoplastic transformation of RK3E by

mutant beta-catenin requires deregulation of Tcf/Lef transcription but not activation of c-myc expression. Mol Cell Biol 1999; 19: 5696-706.

18. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J Immunol Methods 1989; 119: 203-10.

19. Carlsson G, Gullberg B, Hafstrom L. Estimation of liver tumor volume using different formulas an experimental study in rats. J Cancer Res Clin Oncol 1983; 105: 20-3.

20. Kim SA, Kim HW, Kim DK, et al. Rapid induction of malignant tumor in Sprague-Dawley rats by injection of RK3E-ras cells. Cancer Lett 2006; 235: 53-9.

21. Dedrick RL, Myers CE, Bungay PM, DeVita VTJr. Pharmacokinetic rationale for peritoneal drug administration in the treatment of ovarian cancer. Cancer Treat Rep 1978; 62: 1-11.

22. de Bree E, Witkamp AJ, Zoetmulder FA. Intraperitoneal chemotherapy for colorectal cancer. J Surg Oncol 2002; 79: 46-61.

그림설명

Fig.1. **인디루빈유도체의화학적구조.**

인디루빈의 R- group이 Nitro-(5′-nitro-indirubinoxime) group으로 치환되었다.

Indirubin **Indirubin-3'-monoxime** **5'-nitro-indirubinoxime**

Fig.2. RK3E-ras 세포에서 *5′-nitro-indirubinoxime*에 의한 *apoptosis*의 유도.

RK3E-ras 세포에 10 μM의 5′-nitro-indirubinoxime 을 24시간동안 처리하였다. A: RK3E-ras 세포는 Annexin V-FLUOS로 염색한 후 flow cytometric method을 통하여 apoptosis를 조사하였다. B: RK3E-ras 세포는 annexin V-FLUOS과 propidium iodide (PI)로 염색한 후 형광 현미경을 통하여 apoptosis를 조사하였다. C: Total cell lysates 에서 얻은 단백질 (10 μg/lane)을 12% SDS-poly acrylamide gel에서 전기영동하고 caspase 7, cleaved caspase 7, PCNA, actin의 발현 정도를 Western blot analysis로 확인하였다.

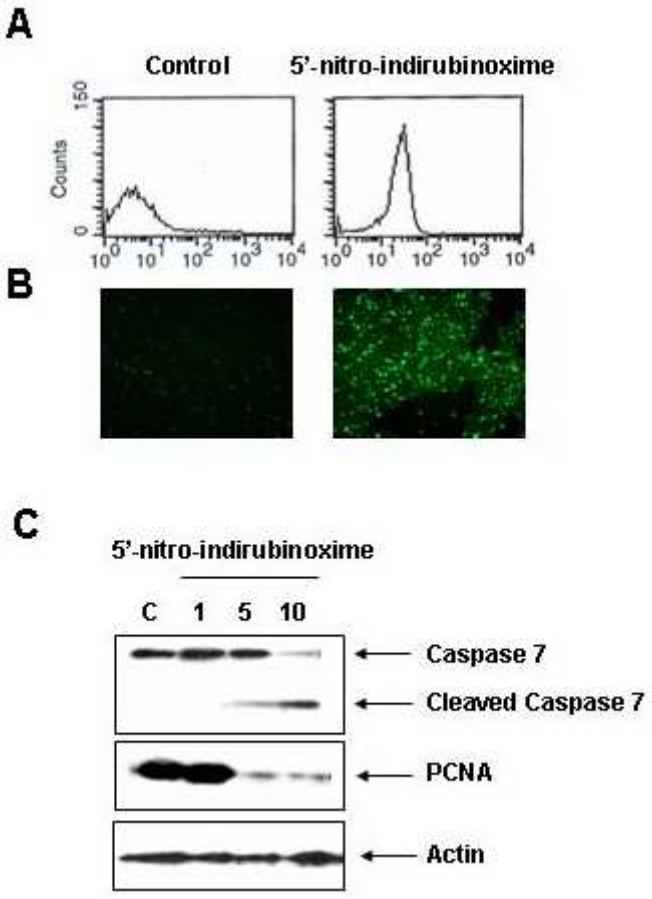


***Fig.3.* 쥐 종양 모델에서 *5′-nitro-indirubinoxime*의 항암 효과.**

RK3E-ras 세포 ($1X10^7$ cells/rat)를 Sprague-Dawley rats 왼쪽 옆구리의 피하에 주입하였다. 세포 주입 후 6일째부터 2일에 한번 씩 총 5회 5′-nitro-indirubinoxime (10 μM/100 μl)을 종양에 직접 주사하였다. A: 종양의 부피는 caliper로 측정하였고 $V=(ab^2)/2$ ('a'는 종양의 최대직경, 'b'는 종양의 최소직경)라는 공식으로 계산하여 평균, 표준편차를 구하였다. B: Softex X-ray는 세포 주입 후 15일째에 촬영하였다.

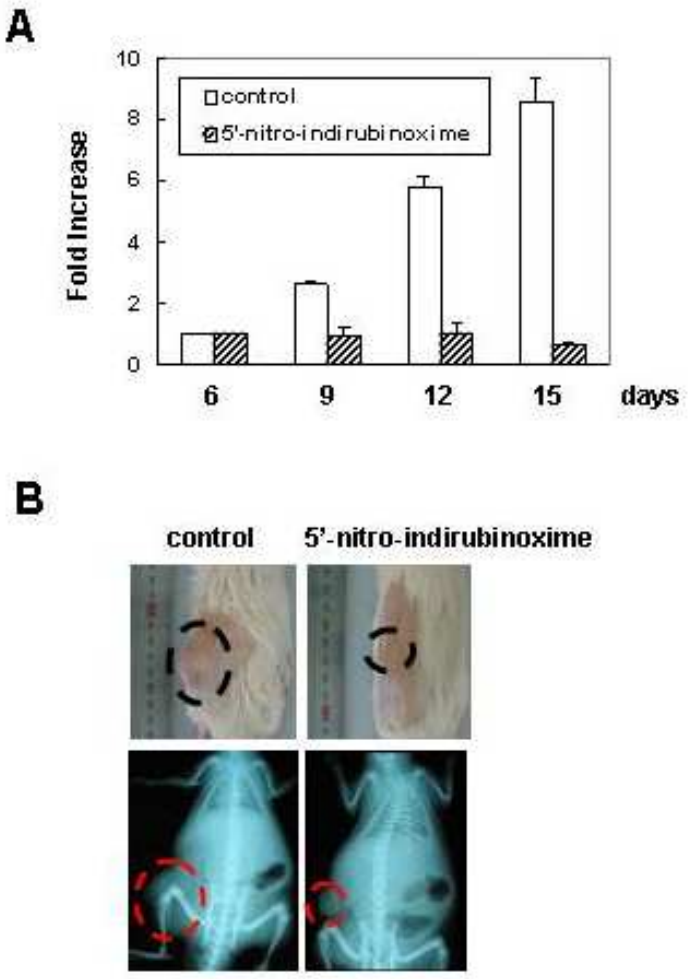


***Fig.4.* 구강종양모델에서 *5′-nitro-indirubinoxime*의 항암작용.**

RK3E-ras 세포 ($5X10^6$ cell/rat)를 SD rat의 구강점막에 주사하고 3일째부터 2일에 한번 씩 총 5회 5′-nitro-indirubinoxime (10 μM/100 μl)을 구강 종양에 직접 주사하였다. Softex X-ray는 세포 주입 후 12일째에 촬영하였다.

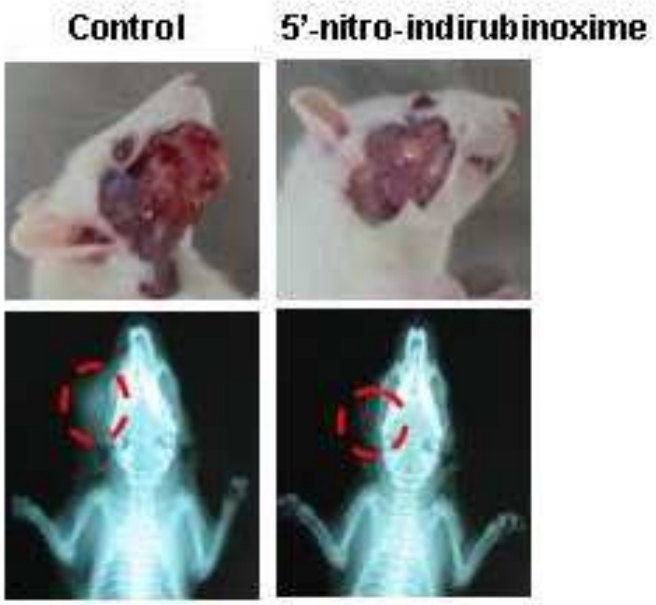
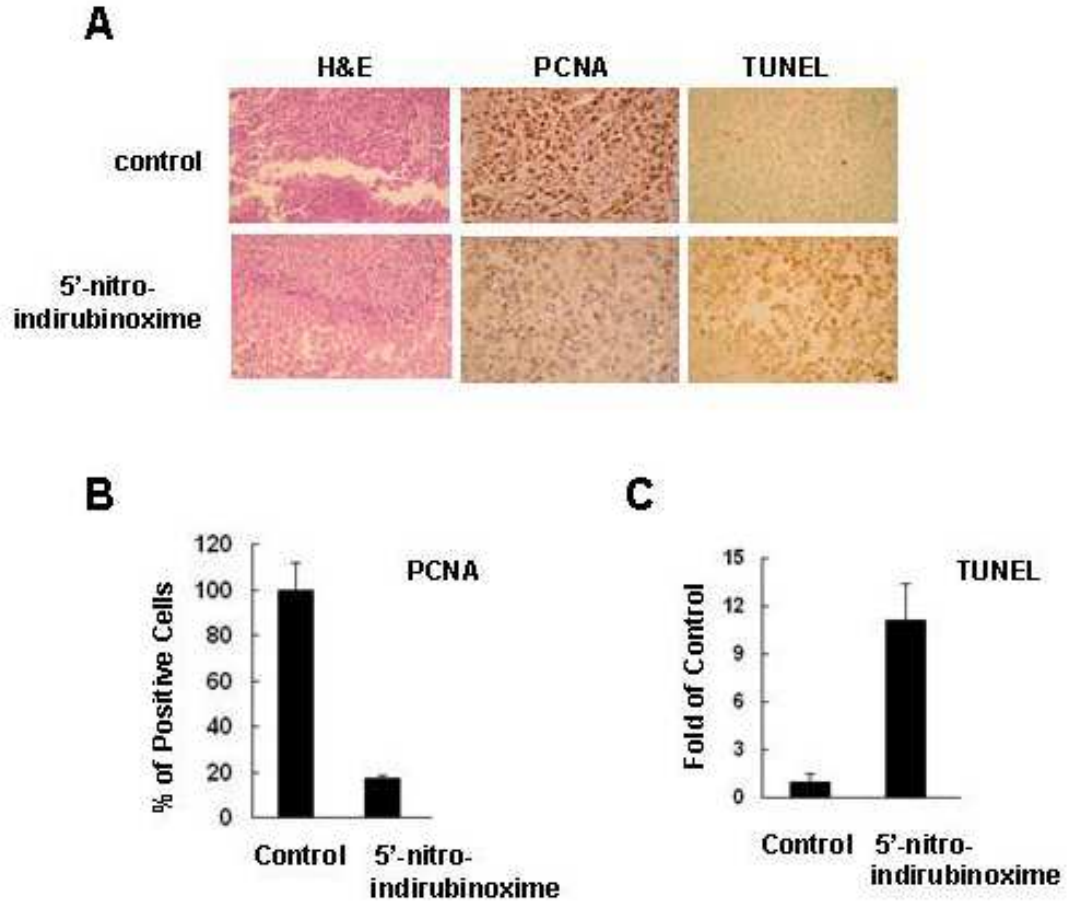


*Fig.5. RK3E-ras*세포로유도된종양의조직학적,면역조직화학적소견.

A: RK3E-ras 세포를 쥐의 왼쪽 옆구리에 피하 주사하고 6일째부터 2일에 한번씩 5′-nitro-indirubinoxime (10 μM/100 μl)을 종양에 직접 주사하였다. A: 세포 주입 후 15일째에 쥐를 희생



저작물 이용 허락서

학 과	치의학과	학 번	10341153	과 정	박사
성 명	한글: 홍 광 진 한문:		영문: Hong Kwang Jin		
주 소	강원도 춘천시 조양동 37-17 이튼치과				
연락처	E-MAIL : tenorhong@hotmail.com				
논문제목	한글 : 쥐 종양 모델에서 인디루빈유도체인 5′-nitro-indirubinoxime에 의한 종양 억제 효과 영문 : Anti-tumor Activity of 5′-nitro-indirubinoxime in Rat Tumor Model				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(0) 반대( )

2006 년 12월 일

저작자: 홍 광 진 (인)

조선대학교 총장 귀하